[Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin; Direktor: Geheimrat Prof. Dr. A. Heffter (Abteilung für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie, Vorsteher: Prof. Dr. E. Friedberger).]

Beiträge zur Frage der heterogenetischen Antikörper.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen medizinischen Fakultät
an der
Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin
vorgelegt von

Friedrich Schiff,
Medizinalpraktikant.

ACAD. LUGD. BAT. BIBL.

Tag der Promotion: 10. Oktober 1914.

Jena,
Gustav Fischer.
1914.

[Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin; Direktor: Geheimrat Prof. Dr. A. Heffter (Abteilung für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie, Vorsteher: Prof. Dr. E. Friedberger).]

Beiträge zur Frage der heterogenetischen Antikörper.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen medizinischen Fakultät

an der

Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin

vorgelegt von

Friedrich Schiff,
Medizinalpraktikant.

ACAD. LUGD. BAT. BIBL.

Tag der Promotion: 10. Oktober 1914.

Jena,
Gustav Fischer.
1914.

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Berlin.

Referent: Prof. Dr. Heffter.

Abdruck aus der
Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie.
I. Teil. Originale. Bd. XX.

Die ursprüngliche Ansicht, daß den hämolytischen Immunkörpern eine strenge Spezifizität im eigentlichen Sinne des Wortes, also eine Wirkung nur gegen das Eiweiß der das Antigen liefernden fremden Species zukomme, mußte modifiziert werden, als es Ehrlich und Morgenroth[1]) gelungen war, durch intraperitoneale Vorbehandlung von Ziegen mit dem Blute anderer Ziegen hämolytische Sera zu erhalten, die neben dem Blute mancher Ziegen auch Hammelblut auflösten, durch Immunisierung von Kaninchen mit Rinderblut ein Hämolysin nicht nur gegen Rinderblut, sondern auch gegen Hammelblut.

Von diesen und ähnlichen Beobachtungen ausgehend, gaben Ehrlich und Morgenroth dem Spezifizitätsbegriff eine allgemeinere Fassung, die sowohl für die bisher bekannten Erscheinungen, wie auch, wie sich in der Folge herausgestellt hat, für eine große Reihe von bis dahin noch nicht bekannten Tatsachen anwendbar war, eine Fassung, die insofern den bisherigen Anschauungen schroff gegenüberstand, als sie die Bedeutung der Species für die Spezifizität als eine mehr zufällige und nicht unbedingt notwendige hinstellte.

Erwachsen auf dem Boden der struktur-chemischen Anschauungen Ehrlichs, nimmt die Ehrlich-Morgenrothsche Definition der Spezifizität den aus der Ehrlichschen Seitenkettentheorie bekannten Begriff des Rezeptors zu Hilfe. Indem aber Ehrlich und Morgenroth[2]) unter Rezeptoren

1) Ehrlich und Morgenroth, Ueber Hämolysine, III. Mitteilung. Berl. klin. Wochenschr., 1900, No. 21.

2) Ehrlich und Morgenroth, III. Mitteilung.

„diejenigen bindenden Gruppen im Protoplasmamolekül“ verstehen, „an welchen eine fremde eingeführte Gruppe anhaftet“, setzen sie nichts voraus als die sehr allgemeine Betrachtungsweise des Ehrlichschen Verteilungsprinzips, und es kann deshalb der Begriff des Rezeptors zur Beschreibung von tatsächlichen Verhältnissen lediglich als „ordnendes Prinzip“, wie sich Morgenroth[1]) ausdrückt, verwendet werden. Nur in diesem Sinne soll in dieser Arbeit von Rezeptoren die Rede sein.

Nach der Auffassung von Ehrlich und Morgenroth[2]) sind die Antikörper spezifisch nicht gegen das gesamte Arteiweiß, sondern gegen die Teile des Eiweißmoleküls, die die Antikörperbildung ausgelöst haben, in der Sprache der Seitenkettentheorie gegen die Rezeptoren, soweit sie haptophore Gruppen im Antiserum liefernden Organismus vorgefunden haben. Von der Gesamtheit der z. B. im Hammelblutkörperchen vorhandenen Rezeptoren sind aber nicht alle ein Bestandteil nur des Hammelblutkörperchens, sondern einzelne finden sich z. B. auch im Rinderblutkörperchen, andere sind, wie schon in ihrer 6. Mitteilung über Hämolysine Ehrlich und Morgenroth hervorgehoben haben, weit verbreitet im Tierreich, unabhängig von der Stellung ihres Trägers im zoologischen System, wofür von ihnen als Beispiel das Vorhandensein von Rezeptoren für Ricin und Abrin bei sehr verschiedenartigen Tieren angeführt wird.

Diese letztere Beobachtung trat zunächst ganz in den Hintergrund gegenüber den Erfahrungen bei der praktischen Eiweißdifferenzierung, die gelehrt haben, daß das gemeinsame Vorkommen von Rezeptorengruppen bei artverschiedenen Tieren sich gewöhnlich beschränkt auf solche Formen, die zoologisch oder botanisch einander sehr nahe stehen, so daß sogar in Fällen, in denen vom Standpunkt der Systematik aus keine sehr nahe Verwandtschaft zu bestehen schien, trotzdem lediglich aus dem serologischen Verhalten auf das Vorhandensein einer solchen im Sinne der Deszendenztheorie geschlossen wurde (Uhlenhuth, Marshall, Nuttall). Ausnahmen, z. B. Antimenschensera, die auch gegen Pferdeblut gerichtet waren, wurden gelegentlich beobachtet, eine prinzipielle Bedeutung diesen „übergreifenden“ Seris aber nicht zugeschrieben.

So erschien es als Widerspruch mit dem in weiteren Kreisen immer noch festgehaltenen Begriff der Artspezifizität, aber sehr wohl in Einklang mit dem von Ehrlich und Morgenroth begründeten Begriff der Rezeptorenspezifizität, als in einer Reihe von Untersuchungen, deren erste die bekannte von Uhlenhuth[3]) über die Spezifizität der Linsensubstanz

1) Morgenroth und Rosenthal, Biochem. Zeitschr., Bd. 39, 1912, p. 97.

2) Ehrlich und Morgenroth, Ueber Hämolysine, VI. Mitteilung. Berl. klin. Wochenschr., 1901, No. 21 und 22.

3) Uhlenhuth, Festschrift für R. Koch, 1903.

war, gezeigt werden konnte, daß manchen Organzellen eine neben und ganz oder zum Teil unabhängig von der Artspezifizität bestehende Organspezifizität zukomme.

Auch Experimente, die zur Aufstellung des Begriffes der Zustandsspezifizität führten, und die wichtige neue Gesichtspunkte ergaben (Obermayer und Pick), vermochten die allgemeine Gültigkeit der Rezeptorenspezifizität nicht einzuschränken.

Auf das Vorkommen gleichartiger bindender Rezeptoren bei sehr verschiedenen Tierarten hatten schon die Untersuchungen von Ehrlich über das Ricin und Abrin hingedeutet. Eine Deutung in demselben Sinne forderten später noch zahlreiche andere Befunde, so die von Sachs[1]) beim Arachnolysin erhobenen und neuerdings ganz besonders die von Morgenroth und Rosenthal[2]).

Dagegen lagen zunächst keinerlei Angaben vor über ein entsprechendes Vorkommen von antikörperbildenden Rezeptoren; auf ein solches wurde zum ersten Male mit Bewußtsein hingewiesen in Untersuchungen von v. Dungern und Hirschfeld[3]) sowie v. Dungern und Brockmann[4]) über Hämagglutinine. Diese Autoren fanden nicht nur im Menschenserum Agglutinine, die durch Blutkörperchen ganz verschiedener Tierarten adsorbiert wurden, sondern sie erhielten auch nach Immunisierung eines Kaninchens und eines Hundes mit Menschenblut Immunsera, die auch Hundeblut agglutinierten. Immerhin handelte es sich hier nicht um regelmäßige Befunde und die erzeugten Agglutinine standen an Stärke hinter den gegen das Antigen gerichteten weit zurück.

Versuche von Frouin und Lisbonne[5]), die durch Injektion von „huile d'œuf", dem früher offizinellen Eieröl, Hämolysine gegen verschiedene Tierarten erzielt haben wollten, fanden wegen ihrer Unwahrscheinlichkeit keine Beachtung, um so weniger, als es sich nur um schwache Hämolysine handelte und eine Täuschung durch schon vorhandene normale nahelag.

Diese Möglichkeit war gänzlich auszuschließen bei Versuchen, über die Forssman[6]) 1911 berichtete. Forssman erhielt durch parenterale Zufuhr von Meerschweinchenorganzellen sowie von Pferdenierenemulsion bei Kaninchen

---

1) Sachs, Hofmeisters Beitr., Bd. 2, 1902.

2) Morgenroth und Rosenthal, Biochem. Zeitschr., Bd. 36, 1911; Bd. 39, 1912.

3) v. Dungern und Hirschfeld, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 8, 1911.

4) Brockmann, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 9, 1911.

5) Frouin et Lisbonne, C. r. Soc. Biol., T. 70, 1911. — Frouin, C. r. Soc. Biol., T. 62, 1907.

6) Forssman, Biochem. Zeitschr., Bd. 37, 1911. F. v. Hintze, ebenda, Bd. 44, 1912.

hochwertige Hämolysine gegen Hammelblut, ein Befund, der seitdem immer wieder bestätigt worden ist. Dies Hämolysin besitzt, wie schon Forssman feststellte und wie eingehendere Untersuchungen von Friedberger und Schiff[1]) bestätigten, durchaus die charakteristischen Eigenschaften eines hämolytischen Ambozeptors. Daß dieser Ambozeptor von den als Antigen verwandten Organen durchweg in vitro gebunden wird, hat entgegen der ursprünglichen Forssmanschen Annahme, aber in Uebereinstimmung mit fast allen Versuchen von Forssman, Orudschiew[2]) betont und im Sinne einer Rezeptorengemeinschaft zwischen den betreffenden Organen und den Hammelblutkörperchen gedeutet.

Doerr und Pick[3]) haben dann die Verbreitung dieser Rezeptorengruppe in der Tierreihe weiter untersucht und ganz ebenso wie bei den von Forssman gefundenen Organen noch ein Bindungs- und Bildungsvermögen für Hammelhämolysin bei den Organen des Hundes und der Katze, des Huhnes und der Schildkröte festgestellt, während Versuche mit den Organen des Rindes, des Schweines und der Taube, sowie einiger anderer Species ein negatives Ergebnis hatten. Die Analyse dieser Verhältnisse im Bindungsversuch hat Orudschiew sowie Doerr und Pick dahin geführt, das zwischen Hammelblutkörperchen und den Organen der angeführten Tierarten angenommene Verhältnis der Rezeptorengemeinschaft dahin zu präzisieren, daß in allen diesen Organen identische Rezeptorengruppen vorhanden seien, die sich im Hammelblutkörperchen neben zahlreichen anderen finden und die durch Kochen nicht zerstört werden.

Bail und Margulies[4]) haben zu den bekannten Tatsachen über den Antagonismus zwischen Tieren mit Hammelhämolysin bindenden bzw. bildenden Organen („Meerschweinchentypus“) und Tieren, deren Organe Hammelhämolysin weder binden noch bilden („Kaninchentypus“), die interessante Beobachtung hinzugefügt, daß das Bindungsvermögen der Meerschweinchenorgane aufgehoben wird durch das Serum von Tieren des Meerschweinchentypus. Sie nehmen aber an, daß ein strenger Gegensatz zwischen Kaninchen- und Meerschweinchentypus nicht besteht, sondern daß Uebergänge vorhanden sind.

Daß auch für das Bildungsvermögen ein scharfer Gegensatz nicht anerkannt werden kann, haben etwa gleichzeitig Friedberger und Schiff[5]) gezeigt, indem sie eine, wenn auch nur geringe Vermehrung der

1) Friedberger und Schiff, Berl. klin. Wochenschr., 1913, No. 39.

2) Orudschiew, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 16, 1913.

3) Doerr und Pick, Biochem. Zeitschr., Bd. 50, 1913. II. Mitteil. Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 19, 1913.

4) Bail und Margulies, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 19, 1913.

5) Friedberger und Schiff, a. a. O.

normalen Hammelhämolysine des Kaninchens durch Organe von Tieren des Kaninchentypus erzielten (Kaninchen- und Rattenorgane, Menschenblutkörperchen).

Friedberger und Schiff machten in derselben Arbeit auf Beziehungen aufmerksam, die zwischen dem Bindungsvermögen der Organe für Hammelhämolysin und ihrer Giftigkeit zu bestehen scheinen.

Sie zeigten, daß bei einer und derselben Tierspecies das Bindungsvermögen der im Tierversuch zu ermittelnden Giftigkeit parallel geht. Sie heben aber ausdrücklich hervor, daß doch nun keineswegs das Bildungs- und Bindungsvermögen sich mit der akuten Giftigkeit deckt!

Von Forssman, Orudschiew, sowie Doerr und Pick sind die durch Forssman und die späteren Untersucher gefundenen Tatsachen auch zu dem Versuch einer Erklärung für die Wirkung der primär toxischen Antisera (Friedberger und Castelli) herangezogen worden.

Sachs und Nathan[1]) haben im Zusammenhang hiermit die Beziehung zwischen Hämolysingehalt und dem Grad der Toxizität bei mit gekochtem Hammelblut von Kaninchen gewonnenen Immunseris untersucht.

Es ist nun auffällig, daß alle diese heterogenetischen Antikörper ein hämolytisches Vermögen nur gegenüber den Blutkörperchen des Hammels (und der Ziege) besitzen. Hierbei sei ausdrücklich hervorgehoben, daß bisher zu derartigen Immunisierungsversuchen nur eine einzige Tierspecies, nämlich das Kaninchen, herangezogen wurde.

Ich untersuchte deshalb auf Veranlassung von Prof. Friedberger und unter seiner Leitung im Anschluß an unsere früheren Studien über heterogenetische Antikörper einerseits, ob auch hämolytische Sera, die nicht gegen Hammelblutkörperchen, sondern gegen andere Blutkörperchen gerichtet sind, durch heterologe Organe eine Abschwächung ihrer hämolytischen Kraft erleiden, andererseits, ob Immunsera, die man bei Behandlung verschiedener Species mit demselben Antigen (Hammelblut) erhält, sich heterologen Organen gegenüber im Bindungsversuch verschieden verhalten.

Die Bindungsversuche wurden angestellt mit wässerigen Extrakten. Die Extrakte wurden, soweit es sich um Laboratoriumstiere handelte, unmittelbar nach der Entblutung bereitet, bei Schlachthoftieren wenige Stunden nach der Schlachtung. Ich benutzte die Methode von Ichikawa[2]).

1) Sachs und Nathan, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 19, 1913.
2) Ichikawa, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 18, 1913.

Es wurden abgewogene Mengen der durch kurze Spülung in physiologischer Kochsalzlösung von eventuell anhaftendem Blut befreiten Organe fein zerschnitten, mit der doppelten Menge physiologischer Kochsalzlösung in der Reibschale verrieben und bei 37° 2 Stunden digeriert. Der Organbrei wurde nunmehr wenige Minuten zentrifugiert und die noch trübe, zellenreiche Flüssigkeit zum Bindungsversuch verwandt. In den Organen enthaltenes Blut setzt sich gewöhnlich in einer deutlich abgegrenzten Schicht zu Boden, so daß es leicht ausgeschaltet werden kann. Die Abgüsse wurden entweder sofort oder nach Aufbewahrung im Frigo benutzt. Mit Extrakten, die älter als 3—4 Tage waren, wurden nur ausnahmsweise Versuche angestellt; es konnte dann in Kontrollversuchen festgestellt werden, daß das Bindungsvermögen sich gegen vorher nicht geändert hatte. Auch 14-tägige Pferde- und Hundenierenextrakte vermochten Hammelblutambozeptoren noch zu binden, wurden jedoch für die in dieser Arbeit erwähnten Versuche nicht angewandt.

Die nach Ichikawa bereiteten wässerigen Extrakte zeigen im Bindungsversuch, wie uns zahlreiche frühere Erfahrungen gelehrt haben, im Prinzip genau dieselben Eigenschaften, wie die von Forssman verwendeten nativen und die von Morgenroth und von Orudschiew benutzten mehrfach gewaschenen Aufschwemmungen, sowie auch wie die nach Doerr und Pick hergestellten Extrakte (Verreiben des Immunserums mit den zerkleinerten Organen).

Geringe quantitative Unterschiede könnten immerhin bestehen; es kam aber hier nur darauf an, Organe zu finden, die das betreffende Antiserum so stark binden, daß eine einfache Adsorption auszuschließen war. Daß bei stark bindenden Organen zwischen einer reichlich Zellen enthaltenden Aufschwemmung und einem sehr zellenarmen Extrakt, der durch stundenlanges Zentrifugieren von allen gröberen Partikelchen befreit war, in der von mir gewöhnlich angewandten Anordnung keine Unterschiede bestehen, zeigt der folgende Versuch.

Versuch 1.

5 g Pferdeniere werden fein zerkleinert, in der Reibschale mit 10 ccm 0,85-proz. Kochsalzlösung verrieben und 2 Stunden bei 37° digeriert. Der Organbrei wird durch Gaze filtriert, dem Filtrat eine Quote (I) entnommen und der Rest des Filtrates 3 Minuten zentrifugiert. Dem noch völlig trüben Abguß wird eine Quote (II) entnommen und der Rest des Abgusses in zwei Teilen (III und IV) im ganzen noch 3 Stunden scharf zentrifugiert. Nach etwa $^1/_2$-stündigem Zentrifugieren wird bei III der Bodensatz jedesmal aufgeschüttelt, bei IV entfernt und nur der Abguß weiter zentrifugiert.

Aufbewahren im Frigo und Bindungsversuch am folgenden Tag.

Schildkrötenmuskel-Kaninchenambozeptor K 33, lösende Dosis für Hammelblut 0,001.

Je 2,0 ccm des 50-fach verdünnten Ambozeptors werden mit 2,0 ccm der 5-fach verdünnten Organextrakte I, II, III, IV, sowie mit 2,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung 1 Stunde bei 37° digeriert. Zentrifugieren sämtlicher Röhrchen und Titration der Abgüsse gegen Hammelblut mit 0,1 ccm Meerschweinchenserum als Komplement.

Hämolyse durch Schildkrötenantiserum.

Menge der Abgüsse	Nach Digerieren mit den Organextrakten				Nativ
	I	II	III	IV	
0,8	Spur	Spur	Spur	Spur	k.
0,6	f. 0	f. 0	f. 0	f. 0	k.
0,4	0	0	0	0	k.
0,2	0	0	0	0	k.
0,6	0	0	0	0	f. k.

Abkürzungen: k. = komplette Hämolyse, f. k. = fast komplette Hämolyse; f. 0 fast keine Hämolyse.

Dieser Versuch nötigt noch nicht zu dem Schluß, daß den Zellen ein Bindungsvermögen überhaupt nicht zukomme, und daß es etwa allein eine wasserlösliche Substanz sein müsse, die die Bindung bewirkt.

In diesen Versuchen waren die Extrakte so konzentriert, daß auch beim scharfen Zentrifugieren immer noch zur Bindung ausreichende Mengen zurückbleiben konnten, zumal Doerr und Pick[1]) festgestellt haben, daß noch sehr geringe Mengen von Pferdeniere Hammelambozeptor zu binden vermögen. Wenn man jedoch mit verdünnten Extrakten die Bindungskraft bestimmt, so sieht man, daß der zellreiche und der fast zellfreie Extrakt sich erheblich unterscheiden.

Während noch die 10-fach verdünnten Extrakte sich annähernd gleich verhalten, bindet bei 50-facher Verdünnung der stundenlang zentrifugierte und von Sediment befreite Extrakt nur schwach, der ebenso lange zentrifugierte, aber nachträglich wieder aufgeschüttelte Extrakt noch sehr erheblich.

Versuch 2.

Verwandt wurden die Extrakte I, III und IV des vorhergehenden Versuches. Mit derselben Ambozeptorverdünnung wie oben wurden gleiche Mengen der 10-, 50- und 100-fach verdünnten Extrakte 1 Stunde bei 37°

1) Doerr und Pick, II. Mitteil., a. a. O.

digeriert, dann die Gemische zentrifugiert und die Abgüsse gegen Hammelblut ausgewertet (Komplement 0,1 Normalmeerschweinchenserum).

Hämolyse durch Schildkrötenimmunserum.

Abgußmenge	Nach Digestion mit den Extrakten									Nativ
	I			II			III			
	Verdünnung der Extrakte									
	1/10	1/50	1/100	1/10	1/50	1/100	1/10	1/50	1/100	
0,8	0	m.	f. k.	f. 0	Hauch	k.	f. 0	k.	k.	k.
0,6	0	schw.	Hauch	0	st.	f. k.	0	k.	k.	k.
0,4	0	Sp.	st.	0	m.	Hauch	0	k.	k.	k.
0,2	0	Sp.	schw.	0	f. 0	m.	0	st.	st.	k.
0,1	0	0	0	0	0	f. 0	0	m.	m.	Hauch

Abkürzungen: k. = komplett, f. k. = fast komplett, st. = stark, m. = mäßig, schw. = schwach, Sp. = Spur.

Versuche mit Hammelmeerschweinchenambozeptor.

Ueber die Eigenschaften eines Hammelmeerschweinchenimmunserums lassen sich nach dem, was über die Beziehungen zwischen Hammelblutkörperchen und Meerschweinchenorganen bisher festgestellt ist, von vornherein bestimmte Voraussetzungen machen.

Forssman[1]) hat gefunden, und Doerr und Pick[2]), sowie eigene Versuche haben das bestätigt, daß man durch Injektion von Pferdeniere beim Meerschweinchen Hammelhämolysin nicht erhielt. Nun binden in vitro die Meerschweinchenorgane das durch Pferdeniere beim Kaninchen erzeugte Hammelhämolysin vollständig. Wenn im Meerschweinchenorganismus ein ähnliches Hämolysin entsteht wie im Kaninchen, und wenn die Meerschweinchenorgane sich in vivo diesem gegenüber nicht anders verhalten als gegenüber dem Hammelkaninchenhämolysin, so müssen im Verlaufe der Immunisierung die Meerschweinchenorgane ein entstehendes Hammelhämolysin dem Kreislauf entziehen. Hiermit steht in Einklang, daß Doerr und Pick bei Meerschweinchen, denen sie Pferdenierenkaninchenambozeptor injiziert hatten, ein sehr rasches Verschwinden aus der Blutbahn beobachtet haben.

1) Forssman a. a. O.
2) Doerr und Pick, I. Mitt. a. a. O.

Falls man nun einem Meerschweinchen Hammelblutkörperchen injiziert, so würden durch elektive Absorption im Verlauf der Immunisierung diejenigen Teile des Antikörpers, die sich gegen die auch im Meerschweinchen vorhandenen Rezeptoren richten, aus dem Blute verschwinden.

Dagegen müßte ceteris paribus das Meerschweinchenimmunserum von Rinderblut gebunden werden bzw. Rinderblut lösen; denn die Meerschweinchenorgane enthalten, wie Orudschiew[1]) gezeigt hat, keine Rezeptoren für den rinderblutlösenden Anteil der Hammelkaninchensera.

Die tatsächlichen Bindungsverhältnisse entsprechen für die Organe, die den Hammelkaninchenambozeptor binden, ganz den Voraussetzungen. Außerdem lassen aber auch alle die Organe, die ihn nicht binden, den Hammelmeerschweinchenambozeptor unbeeinflußt.

Versuch 3.

Bindungsversuch mit Hammelblutmeerschweinchenambozeptor.

Je 2,0 ccm des 50fach verdünnten Ambozeptors F 97 wurden mit 2,0 ccm der 5fach verdünnten Organextrakte bzw. mit 2,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung eine Stunde bei 37° digeriert, dann die Gemische zentrifugiert und die Abgüsse auf Hammelblut titriert. (Komplement 0,1 Normalmeerschweinchenserum.)

Abgußmenge	Hämolyse des Hammelblutes durch Hammelmeerschweinchenambozeptor						
	nach Digestion mit Nierenextrakten von						nativ (entsprechend verdünnt)
	Hammel	Pferd	Rind	Schwein	Kaninchen	Meerschweinchen	
0,6	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.
0,4	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.
0,2	st.	st.	st.	st.	st.	st.	st.
0,1	m.	m.	m.	m.	m.	m.	m.

Abkürzungen wie in Versuch 2.

Ganz entsprechend fielen Bindungsversuche mit Hundeniere, Hundelunge, Rattenlunge, Taubenlunge, Froschlunge, Schildkrötenleber, Aalmuskel, Aalleber aus.

Gegenüber Rinderblut verhielt sich der Hammelmeerschweinchenambozeptor, was von vornherein nicht zu erwarten war, anders als der Hammelkaninchenambozeptor. Rinderblut wurde nämlich nicht gelöst und nicht gebunden. 8 Meer-

1) a. a. O.

schweinchen, die mit Hammelblut immunisiert waren, verhielten sich in dieser Beziehung übereinstimmend.

Dies läßt sich nicht erklären durch eine Rezeptorengemeinschaft zwischen dem Antigen und den Organen des Immuntieres, wie vorhin das Fehlen der Bindung an Pferdeniere gedeutet werden konnte. Hier müßte vielmehr angenommen werden, daß dem Meerschweinchen für diejenigen Rezeptoren, die Hammel- und Rinderblutkörperchen gemeinsam haben, haptophore Gruppen fehlen, so daß hier ein gegen Rinderblut gerichteter Teil des Antikörpers überhaupt nicht entsteht.

Es wurden nun auch Meerschweinchen mit gekochtem Hammelblut behandelt. Da zwischen Meerschweinchenorganen und gekochtem Hammelblut Beziehungen vorhanden sind, die von Doerr und Pick[1]) im Sinne einer Rezeptorengemeinschaft aufgefaßt worden sind, so war es das Wahrscheinlichste, dasselbe Resultat zu erhalten wie bei der Immunisierung mit Pferdeniere, also überhaupt keine Hämolysinbildung.

Bei der Prüfung am 8. Tage nach der Injektion zeigte bei allen vier injizierten Tieren das inaktivierte Serum in Dosen von 0,1 mit 0,1 normalem Meerschweinchenserum als Komplement ein mäßiges Lösungsvermögen für Hammelblut, während das Serum derselben Tiere vorher ebenso wie das von 8 mit Pferde- oder mit Rinderniere behandelten Tieren in derselben Dosis keine Spur von Hämolyse verursachte. Daraufhin wurden die Tiere wiederum mit gekochtem Hammelblut behandelt und nach weiteren 7 Tagen wurden nicht stark, aber jedenfalls deutlich hämolytische Sera erhalten.

Versuch 4.

4 Meerschweinchen im Gewicht von 300—350 g erhalten intraperitoneal am 24. IX. und 30. IX. je 2,0 ccm einer gewaschenen 100-proz. Aufschwemmung von Hammelblut, die 15 Minuten lang gekocht worden war.

7. X. Blutentnahme: bei allen 4 Seris (inaktiviert bei 56°; 0,1 Normalmeerschweinchenserum als Komplement) bewirkt 0,1 Hämolyse mäßigen Grades gegenüber Hammelblut. Pferde-, Rinder- und Kaninchenblut wird nicht hämolysiert.

7. X. und 10. X. Je nochmalige intraperitoneale Injektion wie anfangs.

17. X. Blutentnahme: hämolytischer Titer für Hammelblut bei 2 Tieren 0,06, bei den beiden anderen 0,04. Pferde- und Rinderblut wird nicht hämolysiert.

1) Doerr und Pick, I. Mitt.

Die Sera der mit gekochtem Blut behandelten Meerschweinchen unterscheiden sich von denen der mit nativem Blut behandelten. Das durch natives Blut erzeugte Immunserum wurde nämlich gar nicht, das durch gekochtes erhaltene wenigstens zum Teil von gekochten Hammelblutkörperchen gebunden. Das zeigen die folgenden Versuche.

Versuch 5 und 6.

I. Je 2,0 ccm des 50fach verdünnten Hammelblutmeerschweinchenambozeptors werden gemischt mit 2,0 ccm

1) einer 10-proz. Aufschwemmung gewaschenen nativen Hammelblutes,
2) derselben Aufschwemmung, nachdem sie 15 Minuten gekocht worden war,
3) physiologische Kochsalzlösung.

1 Stunde Digerieren bei 37 °, zentrifugieren und Titration der Abgüsse.

II. Mit dem 5fach verdünnten, nach wiederholter Injektion von gekochtem Hammelblut vom Meerschweinchen F 104 entnommenen Ambozeptor wird der entsprechende Versuch angesetzt.

Abgußmenge	Hämolyse durch Meerschweinchenimmunserum, das hergestellt war durch Injektion von					
	nativem Hammelblut			gekochtem Hammelblut		
	nach Digestion mit		nativ (entsprechend verdünnt)	nach Digestion mit		nativ (entsprechend verdünnt)
	Hammelblut	Hammelblut 100 °		Hammelblut	Hammelblut 100 °	
0,8	f. k.	k.	k.	Sp.	k.	k.
0,6	0	k.	k.	0	trübe	k.
0,4	0	k.	k.	0	trübe	k.
0,2	0	st.	st.	0	st.	st.
0,1	0	Sp.	Sp.	0	Sp.	m.

k. = komplett, st. = stark, m. = mäßig, Sp. = Spur.

Es folgt aus der gelungenen Immunisierung, daß beim Kochen im Hammelblut, abgesehen von denjenigen Rezeptoren, die es mit den Meerschweinchenorganen gemeinsam hat, noch andere erhalten bleiben, die wahrscheinlich im nativen Hammelblut schon vorhanden waren [1]). Dann muß allerdings erwartet

1) Es ist hier auch an die von Rosenthal (Bioch. Zeitschr., Bd. 46, 1912) für osmierte Blutkörperchen erörterte Möglichkeit des Manifestwerdens latenter Rezeptoren zu denken.

werden, daß auch das durch native Hammelblutkörperchen beim Meerschweinchen gewonnene Immunserum wenigstens in geringem Maße von gekochtem Hammelblut gebunden wird. In dem angeführten Versuche ist das nicht der Fall. Es ist aber möglich, daß bei anderen quantitativen Verhältnissen auch der durch native Hammelblutkörperchen erzeugte Ambozeptor an gekochtes Blut gebunden wird.

Der hammelblutlösende Anteil des Rinderkaninchenserums.

Ich behandle hier zunächst die Verhältnisse des hammelblutlösenden Anteils des Rinderkaninchenserums und erst später die des rinderblutlösenden Anteils.

Orudschiew[1]) hat schon festgestellt, daß die hammelblutlösende Komponente des von Kaninchen gewonnenen Rinderimmunserums sich von dem entsprechenden durch Hammelblutinjektion erhaltenen Immunserum dadurch unterscheidet, daß sie nicht durch Organe des Meerschweinchens gebunden wird. (Orudschiew hat hierdurch ausschließen können, daß die „Bindung" etwa durch eine Beeinträchtigung des Komplementes vorgetäuscht sei.)

Ich habe nun die Bindungsverhältnisse des hammelblutlösenden Anteils des Rinderkaninchenserums für die Organe einer Reihe von anderen Tieren sowie auch gegenüber gekochtem und ungekochtem Hammel- und Rinderblut untersucht.

Gegenüber nativem und gekochtem Hammelblut verhält sich der hammelblutlösende Anteil so, wie es nach den Angaben von Orudschiew über das Fehlen der Bindung durch Meerschweinchenorgane zu erwarten war. Der Ambozeptor wird vollständig gebunden durch natives, gar nicht oder fast gar nicht durch gekochtes Hammelblut. Der Hammelblutanteil des Rinderkaninchenserums wird ferner, wie bekannt, durch natives Rinderblut ebenfalls vollständig gebunden; dagegen wird er gar nicht gebunden durch gekochtes Rinderblut, wie der folgende Versuch zeigt.

1) a. a. O.

Versuch 7.

2,0 ccm eines 10-fach verdünnten Rinderkaninchenambozeptors werden mit 2,0 ccm der folgenden 10-proz. Blutkörperchenaufschwemmungen angesetzt:

1) natives Rinderblut,
2) natives Hammelblut,
3) gekochtes Rinderblut,
4) gekochtes Hammelblut.

1 Stunde Digerieren bei 37°, darauf Zentrifugieren und Titration der Abgüsse gegen Hammelblut.

Abguß-menge	Hämolyse von 5-proz. Hammelblut durch Rinderkaninchenserum				
	nach Digestion mit				nativ (entsprechend verdünnt)
	nativem Blut		gekochtem Blut		
	Rind	Hammel	Rind	Hammel	
0,8	0	0	k.	k.	k.
0,6	0	0	k.	k.	k.
0,4	0	0	k.	k.	k.
0,2	0	0	k.	Hauch	k.
0,1	0	0	stark	stark	stark

k. = komplette Hämolyse.

Es verlieren also beim Erhitzen auf 100° sowohl Hammel- als Rinderblutkörperchen die Fähigkeit, den Hammelanteil des Rinderkaninchenserums zu binden. Man darf hieraus schließen, daß alle diejenigen Anteile, die beide Blutkörperchenarten gemeinsam besitzen, nicht hitzebeständig sind.

Durch Digestion mit Organextrakten, wobei dieselben Organe und Tierspecies geprüft wurden, wie in Versuch 3, erlitt der hammelblutlösende Anteil des Rinderkaninchenserums keine Abschwächung.

Versuch 8.

Der 10-fach verdünnte Rinderkaninchenambozeptor wurde mit den 5-fach verdünnten Organextrakten zu gleichen Teilen gemischt. Behandlung der Gemische wie in Versuch 3. Dieselben Organe wie in Versuch 3.

Das hämolytische Vermögen der Abgüsse war in keinem Fall verschieden von dem des entsprechend verdünnten Ambozeptors.

Besonders hervorgehoben sei, daß auch die geprüften Organe des Aales den Ambozeptor nicht gebunden haben. Die

Aalorgane binden ebensowenig, wie ich außerdem festgestellt habe, den Ambozeptor aus einem durch Hammelblut erzeugten Kaninchenantiserum.

Da Friedberger und Schiff gezeigt haben, daß vor allem giftige Organextrakte einen Einfluß auf die Entstehung heterogenetischer Hämolysine haben [1]), so hatten wir zunächst eine intensive Bindung bei den Aalorganextrakten erwartet, die wir entsprechend der bekannten Giftigkeit des Aalserums für hochtoxisch hielten. Zu unserer Ueberraschung stellte sich aber heraus, daß die Organextrakte des Aales gar keine besonders intensive Giftigkeit besitzen. Namentlich der Muskelextrakt steht an Giftigkeit weit hinter der des Serums zurück.

Das Serum der von A. Mosso [2]) untersuchten Aale war schon in den Dosen von 0,05 intravenös injiziert für Kaninchen akut tödlich, vom Serum der von mir in Berlin gebrauchten Flußaale genügt nach den Erfahrungen Dr. Steindorffs in unserem Institut 0,1, um den Tod eines Kaninchens herbeizuführen.

Der Aalmuskelextrakt dagegen hatte, in erheblicher Menge injiziert, nicht den Tod des Tieres zur Folge, der Aalleberextrakt erwies sich als giftiger, aber er war stark blutig gefärbt, so daß eine Interferenz mit der Wirkung von Aalblut nicht ausgeschlossen werden kann.

1) Wir hatten gleichzeitig hervorgehoben, daß auch relativ ungiftige Antigene wie die Rattenniere oder gekochte Hammelerythrocyten (nach einer neueren Untersuchung von Pick ist auch die Pferdelinse hierher zu rechnen) heterogenetisches Hammelhämolysin produzieren. Wir konnten damals aber in einer besonderen Versuchsreihe demonstrieren, daß für die Organe des einzelnen Tieres ein solcher Parallelismus tatsächlich besteht.

Die genaue quantitative Bestimmung des Bindungsvermögens der einzelnen Organe, wie sie Doerr und Pick vorgenommen haben, bestätigen das insofern, als sie Lunge und Myocard sowie Niere am stärksten bindend fanden, während Gehirn, Leber und Milz ein geringeres Bindungsvermögen hatten. Ein Vergleich mit der durch Friedberger und Ichikawa*) für die einzelnen Organe des Kaninchens festgestellten Giftigkeit zeigt, daß hier dieselbe Reihenfolge gilt.

2) A. Mosso, Arch. f. exp. Pathol., Bd. 25, 1889.

*) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 18, 1913.

Versuch 9.

Kaninchen K 29, Gewicht 1650 g, erhält intravenös 3,0 ccm Aalmuskelextrakt (1:2).

Unmittelbar danach Niesen, dann Kotabgang. Wird bald munter, nach 6 Minuten Dyspnoë, scheinbar Paresen, sitzt mit ausgestreckten Vorderbeinen, erholt sich.

Kaninchen K 30, Gewicht 1750 g, erhält intravenös 2,5 ccm Leberextrakt (1:2) (stark blutig gefärbt).

Krämpfe sofort nach der Injektion, tot nach 2 Minuten.

Ich stelle nun noch tabellarisch die Bindungsverhältnisse zusammen, soweit sie geeignet sind, die verschiedenen untersuchten Hammelambozeptoren zu charakterisieren. Dabei rechne ich als Bindungen nur sehr starke Bindungen in dem Sinn, wie sie Doerr und Pick als positiv aufgefaßt haben. Die Angaben über Hammelblut- und Pferdenierenimmunsera sind aus den Arbeiten von Forssman, Orudschiew, sowie Doerr und Pick entnommen. Von ihrer allgemeinen Gültigkeit habe ich mich in fast allen Fällen durch eigene Versuche überzeugt. Die 5 angeführten hammelblutlösenden Ambozeptoren lassen sich, wie aus der Tabelle ersichtlich, durch ihr verschiedenes Verhalten in den Bindungsversuchen unterscheiden. Von dem angeführten Pferdenierenambozeptor nicht zu unterscheiden sind einstweilen die durch Meerschweinchen-, Hunde-, Katzen-, Hühner- und Schildkrötenorgane erzeugten Antisera.

Hammelblutlösende Antisera.

Antigen	Hammelblut, Pferdeniere, Rinderblut (Hammelblut 100°)			Hammelblut, Hammelblut 100°	
Immuntier	Kaninchen			Meerschweinchen	
Bindung durch					
Hammelblut	+	+	+	+	+
Hammelbl. 100°	+	+	—	—	±
Rinderblut	+	—	+	—	—
Rinderblut 100°	.	—	+	—	.
Pferdeniere	+	+	—	—	—
Schweineniere	—	—	—	—	—

+ starke, ± sehr geringe, keine Bindung, . nicht untersucht.

Pferdeblutkaninchenserum.

Als Immuntiere wurden hier, wie bei der Herstellung der weiter unten zu besprechenden Menschen- und Rinderimmunsera Kaninchen verwendet, für deren inaktiviertes Serum vor der Behandlung die kleinste unter Zusatz von 0,1 Meerschweinchenserum Hammelblut komplett lösende Dosis bestimmt worden war. Es ergab sich eine kleine, aber regelmäßige Steigerung des Lösungsvermögens für Hammelblut, was in Analogie zu setzen ist zu der von Friedberger und Schiff nach Injektion von Menschenblut beobachteten Steigerung des hämolytischen Titers für Hammelblut.

Versuch 10.

4 Kaninchen wurden am 25. IX. und 30. IX. mit gründlich in phys. Kochsalzlösung gewaschenen Pferdeblutkörperchen intravenös injiziert (100-proz. Aufschwemmung, je 1,5 ccm). Blutentnahme am 7. X.

Kaninchen No.	Hämolytischer Titer für			
	Hammel	Pferd	Hammel	Pferd[1])
	vor Injektion		nach Injektion	
K 39	> 0,1	> 0,2	0,01	0,003
K 35	> 0,1	dgl.	0,005	0,005
K 36	> 0,2	„	0,04	0,004
K 37	0,08	„	0,02	0,003

Das zu den Bindungsversuchen verwendete Pferdeblutantiserum wurde durch keines der geprüften Organe gebunden. Ich begnüge mich deshalb damit, die Versuchsanordnung anzugeben.

Versuch 11.

2,0 ccm des 100-fach verdünnten Pferdeblutimmunserums K 35 wurden mit 2,0 ccm der 5-fach verdünnten Organextrakte 1 Stunde bei 37° digeriert, sodann zentrifugiert und die Abgüsse mit Pferdeblut (5-proz. Aufschwemmung) titriert. Ebenso wie der entsprechend verdünnte native Ambozeptor lösten die Abgüsse komplett bis zu Mengen von 0,1 (entsprechend 0,0005 des unverdünnten Ambozeptors).

Die geprüften Organe waren Niere von Pferd, Rind, Hammel, Schwein, Hund, Mensch, Lunge von Ratte, Hund, Mensch, Taube, Frosch.

1) Da Pferdeblut sehr stark agglutiniert wurde, war der Titer für Pferdeblut nicht mit völliger Genauigkeit anzugeben.

Menschenblutkaninchenserum.

Die Bindungsversuche fielen hier sämtlich negativ aus. Auch hier beschränke ich mich deshalb bei der völligen Uebereinstimmung aller Versuche auf die Wiedergabe der Versuchsanordnung.

Versuch 12.

Es mußte ein nur schwach hämolytischer Ambozeptor (Kaninchen F22) benutzt werden. Der unverdünnte Ambozeptor wurde in Mengen von 0,5 ccm mit der gleichen Menge der 5-fach verdünnten Organextrakte bzw. mit 10-proz. Blutkörperchenaufschwemmungen gemischt, 1 Stunde bei 37° digeriert und dann zentrifugiert. Die Abgüsse lösten mit 0,1 Meerschweinchenserum 5-proz. gewaschenes Menschenblut noch komplett in Mengen von 0,06 ccm, ebenso wie das native, nur entsprechend verdünnte Serum.

Hammelblut, Rinderblut, Pferdeblut, sowie gekochtes Menschenblut schwächte den Ambozeptor nicht ab.

Von Organen wurden geprüft: Pferdeniere, Rinderniere, Schweineniere, Hammelniere, Kaninchenniere, Kaninchenlunge, Schildkrötenlunge, Froschlunge.

Der rinderblutlösende Anteil des Rinderblutkaninchenserums.

Die Versuche wurden im Zusammenhang mit denjenigen für den hammelblutlösenden Anteil des Rinderblutkaninchenserums angestellt, indem hierbei gleichzeitig das Lösungsvermögen der Abgüsse gegenüber Rinderblut bestimmt wurde.

Ein Organ mit eindeutigem Ambozeptorbindungsvermögen, wie es etwa die Pferdeniere gegenüber Hammelambozeptor besitzt, wurde nicht gefunden.

Gar nicht gebunden wurde der Ambozeptor durch die Nieren von Pferd, Hammel, Schwein, Ratte, Meerschweinchen, Mensch, durch Aalmuskel, Schildkrötenmuskel, Schildkrötenlunge.

Ein sehr mäßiger Grad von Bindung wurde beobachtet bei den Organen eines Hundes (der Versuch wurde mehrfach wiederholt), bei Froschlunge und bei einer Menschenlunge. Da diese Lunge (nicht pathologisch veränderte Lunge eines Kindes) auch die Hammelkomponente des Serums entsprechend beeinflußte, dürfte hier an eine Wirkung auf das Komplement zu denken sein, um so mehr als, wie angeführt, Menschenniere sich indifferent verhielt.

Bei den Hundeorganen (Lunge und Muskel), die, wie besonders geprüft wurde, das hammelblutlösende Schildkrötenimmunserum sehr stark banden, wurde aus dem Rinderimmunserum nur die rinderblutlösende Komponente, allerdings auch nur spurweise abgeschwächt, dagegen nicht die hammelblutlösende.

Ich gebe hier das Protokoll, gleichzeitig als Beispiel für alle anderen mit diesem Ambozeptor ausgeführten Versuche.

Versuch 13.

Je 2,0 ccm des 10-fach verdünnten Rinderkaninchenambozeptors K 13 werden mit 5-fach verdünntem Hundelungenextrakt bzw. mit physiologischer Kochsalzlösung (je 2,0 ccm) 1 Stunde bei 37° digeriert, dann zentrifugiert und die Abgüsse gegen Hammelblut und gegen Rinderblut ausgewertet.

Abgußmenge	Hämolyse von			
	Hammelblut		Rinderblut	
	nach Digestion des Ambozeptors mit Hundelunge	durch nativen Ambozeptor	nach Digestion des Ambozeptors mit Hundelunge	durch nativen Ambozeptor
0,2	k.	k.	k.	k.
0,1	Hauch	Hauch	f. k.	k.
0,08	stark	stark	Hauch	k.
0,06	mäßig	mäßig	stark	k.
0,04	Spur	Spur	mäßig	f. ganz k.
0,02	0	0	Spur	stark
0,01	0	0	0	mäßig

Versuche, durch intravenöse Injektion der zum Bindungsversuch verwandten Hundeorganextrakte, sowie von Frosch- und Menschenorganextrakten beim Kaninchen die Bildung von Rinderhämolysin zu erzielen, hatten bisher keinen Erfolg. Bekanntlich lösen auch die nach Injektion von Meerschweinchenorganen gewonnenen Kaninchensera niemals Rinderblut. Auch für diese Organe hat aber Morgenroth ein mäßiges Bindungsvermögen gegenüber Rinderimmunserum gesehen. Da die Antigenfähigkeit der bindenden Organe einstweilen als Prüfstein für die Spezifizität angesehen werden muß, so können diese schwachen, von mir beobachteten Bindungen zunächst auch als unspezifische Adsorptionen aufgefaßt werden.

Als tatsächliches Ergebnis muß festgestellt werden, daß Beziehungen, wie sie zwischen Hammelblutkörperchen und einer Reihe von heterologen Organen bestehen, Beziehungen,

die als Rezeptorengemeinschaft aufgefaßt worden sind, sich weder für Rinderblut, noch für Pferdeblut, noch für Menschenblut haben auffinden lassen, daß also jene rätselhafte „Rezeptorengruppe“ immer noch eine ganz eigenartige Sonderstellung einnimmt.

Zusammenfassung.

1) Pferdenierenextrakte, die durch mehrstündiges Zentrifugieren möglichst zellfrei gemacht wurden, erfahren eine Verringerung, aber keine Aufhebung ihres Bindungsvermögens für hammelblutlösende Ambozeptoren.

2) Durch Injektion von Hammelblut erhält man beim Meerschweinchen ein Immunserum, das sich von dem entsprechenden beim Kaninchen unterscheidet.

Das Hammelmeerschweinchenserum wird nicht durch diejenigen heterologen Organe abgeschwächt, die nach Forssman bzw. Doerr und Pick das Hammelkaninchenserum binden.

Das Hammelmeerschweinchenserum wird auch von anderen heterologen Organen nicht gebunden.

Das Hammelmeerschweinchenserum wirkt auf Rinderblut nicht lytisch.

3) Vom Kaninchen gewonnene Antisera gegen Pferdeblut, Menschenblut und Rinderblut werden durch eine Reihe heterologer Organe, die zum großen Teil Hammelhämolysin binden, nicht oder doch wenigstens nicht einwandfrei gebunden.

Lebenslauf.

Der Verfasser dieser Dissertation, Friedrich Schiff, Sohn des Schriftstellers und Arztes Dr. med. Emil Schiff, jüdischer Religion, wurde am 23. Februar 1889 zu Berlin geboren. Er besuchte, seit 1897, das Königl. Wilhelms-Gymnasium zu Berlin, das er Michaelis 1907 mit dem Zeugnis der Reife verließ. Von 1907 bis zum Sommer 1912 war er nacheinander an den medizinischen Fakultäten zu Freiburg, Berlin, München und zuletzt wiederum zu Berlin immatrikuliert. Das medizinische Staatsexamen bestand er im Januar 1913.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.